I.7 Immunologie	2/4. Les anticorps, agents du maintien de l'intégrité du milieu extracellulaire

Au cours de l'infection par le virus VIH, des anticorps anti-VIH apparaissent dans le sang. Ce sont ces anticorps qui sont recherchés dans les tests de séropositivité (ELISA et Western blot).

Comment se déroule la réponse immunitaire à base d'anticorps ?

Capacités	Activité 1. Mise en évidence de la spécificité d'une réaction antigène-anticorps.

Utilisation de la méthode d'Ouchterlony (ou test d'immunodiffusion)

La méthode repose sur l'**immunodiffusion** : les solutions sont déposées dans des puits et diffusent de façon homogène dans toutes les directions autour du puits. Deux auréoles de diffusion de deux puits différents peuvent donc entrer en contact lorsqu'elles ont suffisamment progressé.

- Cette **zone de contact reste invisible** s'il n'y a pas de réaction entre les deux solutions.
- En revanche, elle se traduit par un **arc de précipitation** visible à l'œil nu lorsque les deux solutions réagissent.

Schéma des arcs : livre page 242, document 1.

On veut montrer qu'un anticorps (ici l'anticorps anti-BSA) est spécifique d'un antigène.

Pour cela, on formule 3 hypothèses :

H1. L'anticorps anti-BSA est capable de reconnaître toutes les molécules d'albumine : il est spécifique de l'albumine.

H2. L'anticorps anti-BSA reconnaît les albumines du lait de vache et du sérum de bœuf, il est spécifique de l'albumine bovine.

H3. L'anticorps anti-BSA ne reconnaît que l'albumine de sérum de bœuf, il en est spécifique.

On teste ces trois hypothèses par la méthode d'immunodiffusion, ou test d'Ouchterlony.

Matériel :

- une boîte de Pétri contenant de l'agar, deux boîtes de Pétri vides,
- petite feuille de papier noir (lecture des résultats à la séance suivante),
- un emporte-pièce,
- sérum de lapin contenant des anticorps anti BSA (Albumine de Sérum de Bœuf) = S (rouge),
- différents antigènes :
  * sérum de chèvre = H (rose)
  * albumine de lait de vache = L (mauve)
  * albumine de sérum de bœuf = B (blanc)
  * albumine de sérum de cheval = C (gris)
  * eau distillée = E (noir)
- 1 compte gouttes ; 1 marqueur pour plastique (pour marquer la boîte de Pétri).

Réaliser un tableau (deux entrées)
- les 3 hypothèses et chaque antigène apparaissent distinctement aux deux entrées du tableau
- la présence ou non d'un arc de précipitation indiquée
- titre adapté exactitude des contenus

Réaliser une manipulation d'après un protocole
- préparation et coulage de la gélose ;
- réalisation des 6 puits ;
- repérage efficace et non ambigu, des puits et des produits ;
- utilisation judicieuse du matériel (une pipette par produit) dépôts soignés.

Réaliser un schéma
- conformité avec l'observation
- titre adapté
- légende complète et exacte travail clair et soigné

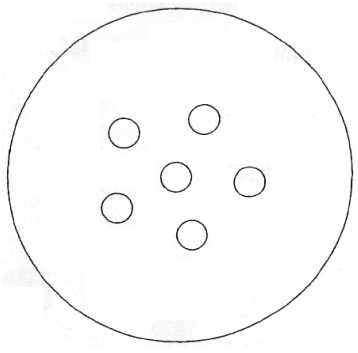
Adopter une démarche explicative
- observation des résultats
- validation de la bonne hypothèse

1- **Faire un tableau** des conséquences vérifiables de chaque hypothèse concernant les résultats possibles des réactions entre le sérum S et les différents antigènes (**arc ou non**).

Les manipulations suivantes doivent se faire sur un plan de travail propre et bien débarrassé.

2- **Préparer le gel d'Agar (à 2%) à couler dans votre boîte de Pétri pour l'expérience.**
- A. **Peser** dans un papier 0,2g d'Agar prélevé à l'aide de la spatule (tarer la balance avant !).
- B. **Verser** 10 mL d'eau ~~distillée~~ puis l'Agar dans le Bécher et **dissoudre** soigneusement l'Agar avec la spatule.
- C. **Chauffer** le mélange en remuant à la spatule jusqu'à ce que le mélange devienne limpide et **arrêter au tout début de l'ébullition.**
- D. **Retirer** à l'aide du chiffon (ou de la pince en bois) **et attendre** quelques secondes pour manipuler le bécher sans se brûler.
- E. **Pipeter** 5 mL de gel d'Agar chaud et fluide et le verser dans une boîte de Pétri.
- F. **Egaliser** le niveau et **supprimer** rapidement les bulles.
- G. **Ne pas remuer les boîtes pendant dix minutes au moins (prise de l'Agar)**.

2- **Creuser** les puits dans la gélose selon les indications ci-dessous.



Creuser les puits avec l'emporte-pièce selon le modèle ci-contre. En cas de problème, quelques boîtes supplémentaires sont à votre disposition. ***Éviter surtout les fissures et les bords non nets.*** Éliminer éventuellement les disques de gélose avec un cure-dent.

3- **Réfléchir** à l'emplacement des différents produits (sérum et anticorps) puis **marquer** sur la boîte de Pétri leur disposition, permettant de révéler la réaction de l'anticorps étudié avec les différents antigènes proposés (marquage sous la boîte ou sur la tranche, surtout pas sur le

	couvercle !). ***Appeler pour vérification avant de passer au 4.*** 4- **Réaliser** les dépôts des substances proposées dans les puits de la boîte préparée en s'aidant des consignes ci-dessous. *La solution prélevée dans le tube avec une pipette propre doit être déposée dans le puits sans débordement ni bulles, et sans endommager le gel d'Agar.* ***On attend au moins 24 heures avant de voir les résultats*** 5- **Faire un schéma** de la boîte de résultats. 6- **Expliquer** laquelle des 3 hypothèses proposées est validée par ces résultats en les confrontant à votre tableau.
	Activité 2 : rôle des anticorps dans la réponse immunitaire.
Utiliser un logiciel de visualisation de modèles moléculaires : - Utilisation des fonctionnalités du logiciel - Obtention de résultats - Fermeture du logiciel en fin de séance. **Réaliser un schéma :** - simplification des structures - validité du schéma et des légendes - soin - titre pertinent. **Exploiter des résultats expérimentaux**	**Doc1. Structure d'un anticorps.** ↓↓↓↓↓↓↓↓ Il est possible d'observer la structure d'un anticorps pas le logiciel *RasTop* (mode d'emploi, voir TP procréation 6). - **Ouvrir** Rastop. Sélectionner la séquence IGG-TOTAL.pdb dans le répertoire bankmol (12-immunologie). Apparaît alors à l'écran une molécule d'anticorps circulant, anti-lysozyme. - **Représenter** la molécule d'anticorps en sphères (avec les atomes représentés en couleur). - **Rechercher** le nombre de chaînes d'acides aminés qui constituent cet anticorps. Pour cela, **aller** dans le menu « atome » puis « **colorer** par chaîne ». **Noter** vos observations. *Remarque : la partie en rouge correspond à un glucide qui est hors-programme. Vous pouvez l'effacer en le sélectionnant et en l'effaçant.* - On veut maintenant visualiser les liaisons entre les diverses chaînes. Pour cela, il faut changer de mode de représentation. On fait tout d'abord apparaître le squelette carboné : pour cela **aller** dans le menu « ruban » « squelette carboné ». Par la suite, il faut **effacer** les atomes dans « atomes » « représentation – effacer ». - Pour **visualiser** les liaisons, il faut désormais les faire apparaître, et notamment celles qui sont intéressantes : il s'agit de ponts disulfures (liaison covalente entre deux atomes de soufre de deux acides aminés cystéine). Pour faire apparaître les liaisons « liaisons – ponts disulfures – afficher ». Vous devez les distinguer… mais très mal ! - Pour les mettre en évidence il est possible de les **colorer** spécifiquement. L'utilisation de la palette de coloration doit vous aider. Il faut juste **choisir** « Ponts disulfures » dans la liste déroulante puis une couleur. Ils sont un peu plus visibles. - La sélection des seuls atomes de soufre se fait dans la liste déroulante « éléments ». - Une fois l'élément choisi, la sélection n'est effective qu'en actionnant le bouton situé à droite. Les atomes de soufre seront alors affichés en utilisant l'icône « Boules et Bâtonnets ». La sélection d'une couleur pour les atomes dans la palette termine la mise en évidence des ponts disulfures. - Une fois ces opérations faites, **afficher** la palette de couleur et colorer le fond en blanc, puis **imprimer**. *Qu1. À partir de ces données, **réaliser** un schéma de la molécule d'anticorps (avec uniquement les ponts SS interchaînes).* On veut désormais étudier la formation des complexes immuns (= en gros l'association entre l'anticorps et « l'élément étranger », ou antigène) avec Rastop. - Le fichier IGG-LYS.PDB contient la représentation des extrémités des chaînes lourdes et légères (voir votre schéma précédent) associées à l'antigène constitué par une molécule de lysozyme. - **Utiliser** l'affichage en sphère, puis la coloration par chaîne pour distinguer l'antigène en rouge, l'extrémité de la chaîne lourde en bleu et celle de la chaîne légère en vert (couleurs par défaut). - **Sélectionner** par la suite les chaînes de l'anticorps, et les **représenter** en « Boules et Bâtonnets ». L'antigène doit rester en sphères. **Imprimer.** - On veut mieux **observer** la zone de jonction entre anticorps et antigène. Pour cela, on va **réaliser** une coupe et un zoom. - En sélectionnant Trans/Zoom, les actions sur les curseurs sont interprétées comme des translations selon l'un des trois axes. Cela permet de centrer l'observation sur la zone de contact entre anticorps et antigène. - La fonction de coupe est commandée par un petit tableau situé en centre de la barre inférieure (front et flèche droite pour une coupe frontale). *Qu2. **Indiquer** ce que vous constatez en ce qui concerne les rapports anticorps-antigène, et qui explique les résultats observés dans l'expérience d'Ouchterlony.*

Analyser un diagramme en bâtons

Pour la suite, on observe le document 2 page 244.

Doc1. Analyse expérimentale du rôle des différentes régions de l'anticorps. © Belin TS 2002

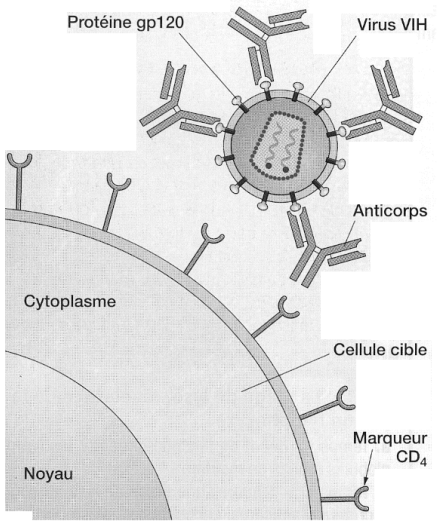
*Qu3. **Analyser** et **interpréter** chaque expérience. **Compléter** le schéma réalisé avec RasTop et le **légender** à partir de vos interprétations.*

Document 3 page 245.

Doc2. Les caractéristiques des sites de reconnaissance antigénique. Les flèches indiquent les acides aminés faisant partie du site de fixation de l'antigène. © Belin TS 2002 page 245.

*Qu4. **Prélever** les informations et **interpréter** ce document. **Indiquer** notamment la relation existant entre sites de reconnaissance et variabilité des acides aminés. **Compléter** alors le schéma précédent.*

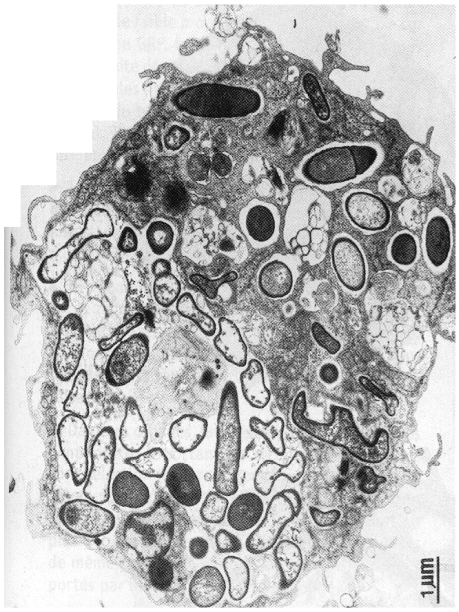
Compléter un schéma

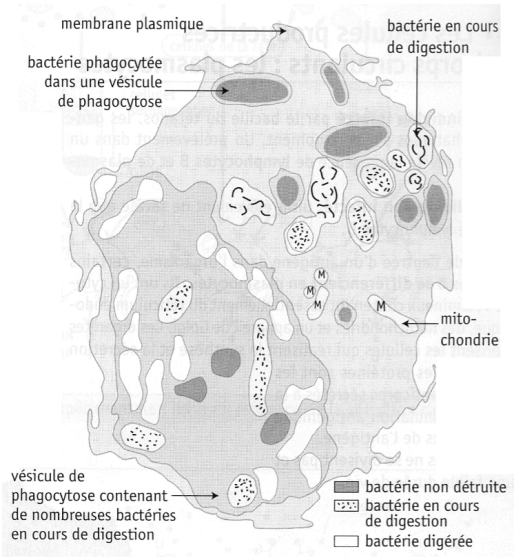


Doc3. Mode d'action des anticorps.
Exemple du virus VIH. © Hatier TS 2002

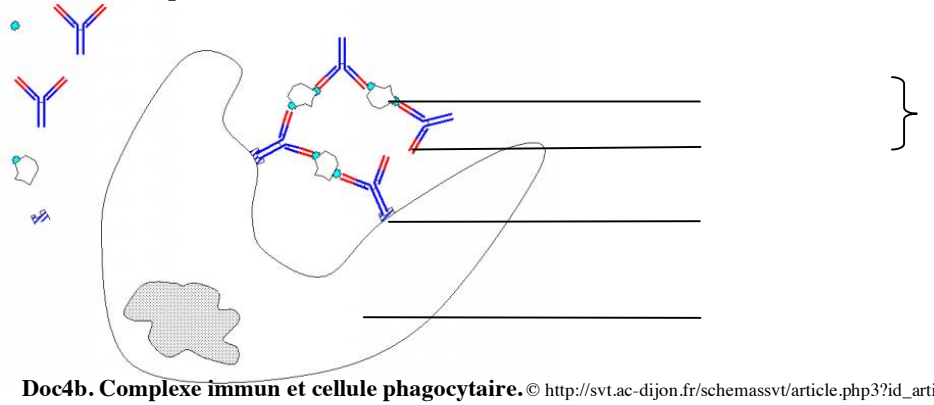
*Qu5. On parle de complexe immun lorsque des anticorps se lient à un antigène. **Préciser** le rôle de ce complexe abordé dans ce document.*

Interpréter un document en microscopie électronique par transmission (MET)




membrane plasmique
bactérie en cours de digestion
bactérie phagocytée dans une vésicule de phagocytose
M
mito-chondrie
vésicule de phagocytose contenant de nombreuses bactéries en cours de digestion
bactérie non détruite
bactérie en cours de digestion
bactérie digérée

Doc4a. Microscopie électronique de la phagocytose effectuée par un macrophage (et schéma d'interprétation). © Didier TS 2002



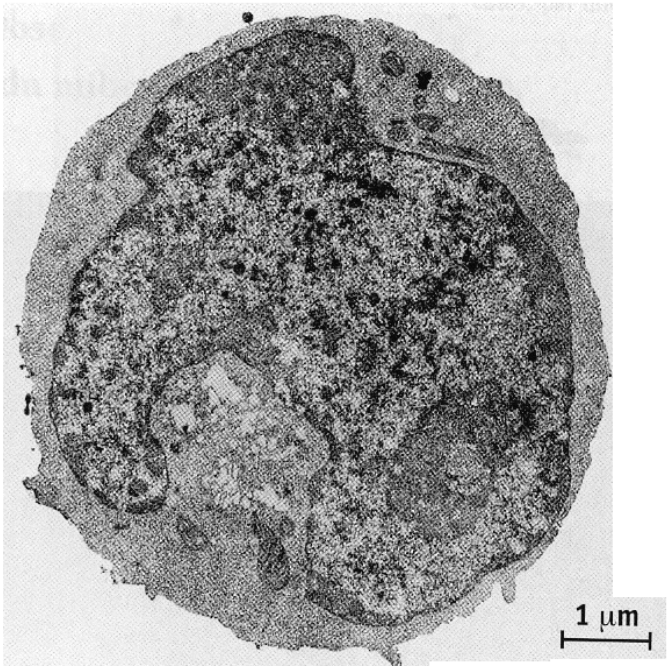
Doc4b. Complexe immun et cellule phagocytaire. © http://svt.ac-dijon.fr/schemassvt/article.php3?id_article=442

*Qu6. **Donner** une définition à la phagocytose.*
***Interpréter** le rôle des anticorps dans la phagocytose. **Relier** au document 3 (VIH).*
***Compléter** les légendes manquantes.*
***Compléter** le schéma effectué en Qu1 avec les nouvelles informations.*

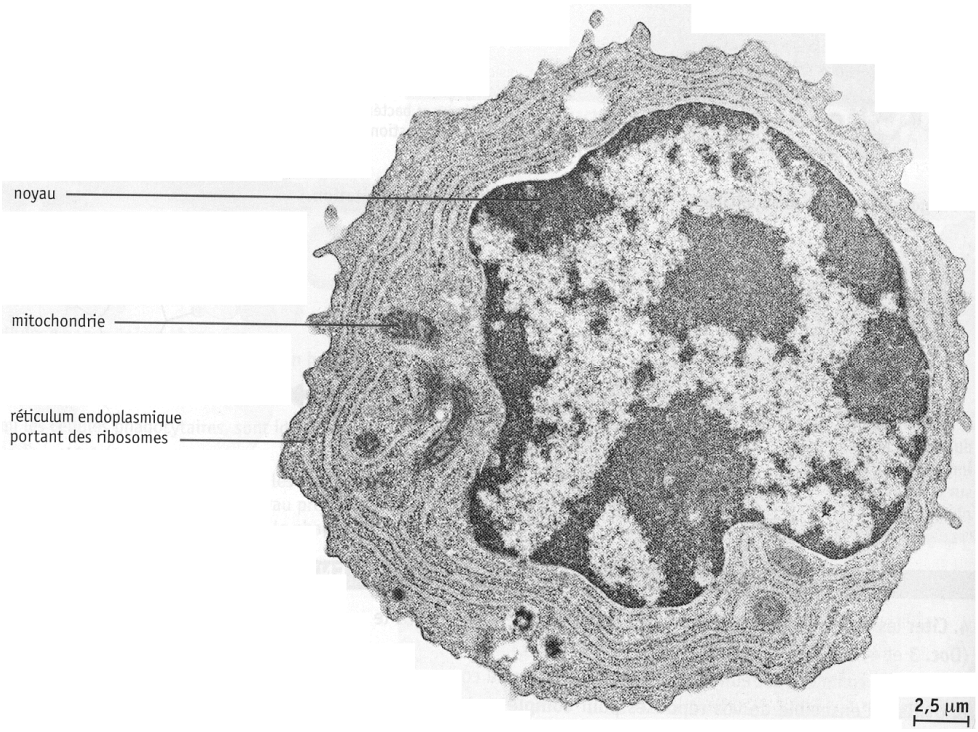
On cherche maintenant à déterminer comment sont produits les anticorps lors d'une réaction immunitaire.

Chez un individu infecté par le bacille du tétanos, les ganglions lymphatiques s'hypertrophient. Un prélèvement dans un tel ganglion révèle la présence de lymphocytes B et de plasmocytes spécifiques du bacille du tétanos.
Chez un individu non infecté, un prélèvement ne révèle que la présence de lymphocytes B.
À la suite de l'entrée d'un antigène dans l'organisme, certains lymphocytes B se différencient en plasmocytes. Les plasmocytes ne se divisent pas et ont une faible durée de vie.

Interpréter un document en microscopie électronique par transmission (MET)

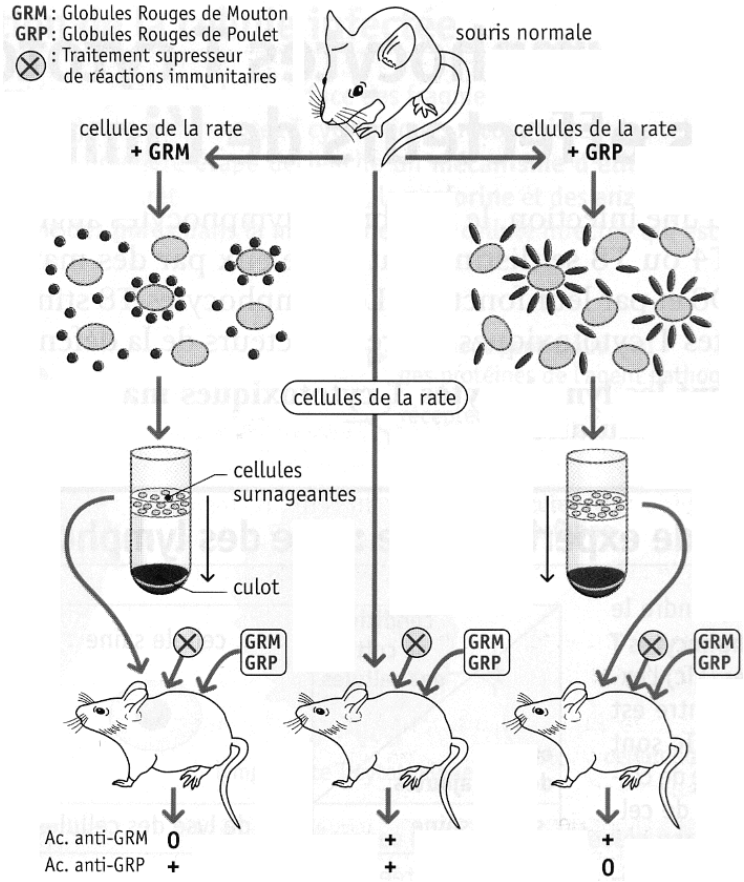


Doc5a. Un lymphocyte B en microscopie électronique. © Didier TS 2002

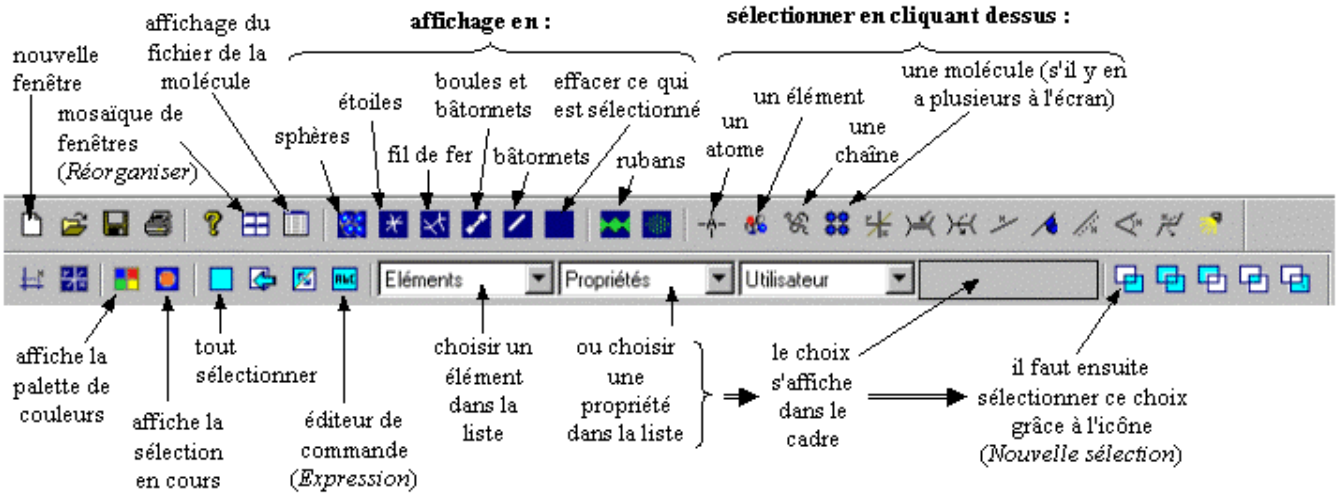


Doc5b. Un plasmocyte en microscopie électronique. © Didier TS 2002.
Remarque : ces cellules possèdent également un appareil de Golgi non visible ici.

*Qu7. **Comparer** les deux cellules et **donner** le rôle des organites présents dans les plasmocytes. **Préciser** alors le rôle des plasmocytes (lien avec les documents précédents).*

Analyser une expérience	Afin de mettre en évidence **comment s'effectue la sélection des lymphocytes B**, des cultures de cellules sont réalisées. Des lymphocytes de souris normale sont mis en présence de globules rouges de mouton (GRM) ou de globules rouges de poulet (GRP). Une faible proportion d'entre eux se fixe sur les GRM ou GRP, formant des rosettes. Les cellules sont ensuite déposées dans un tube et centrifugées. Les globules rouges et les rosettes forment un culot au fond du tube. Seuls les lymphocytes libres surnagent. Ils sont injectés à des souris dont l'immunité propre est supprimée. Les lymphocytes B **possèdent à leur surface des récepteurs membranaires, les anticorps (qui ne sont pas libres dans le sang, dans ce cas là)**. NB : la rate est un organe lymphoïde : elle contient de nombreux lymphocytes.  **Doc6. Une étude expérimentale.** © Didier TS 2002 *Qu8. **Analyser** l'expérience et **montrer** que des lymphocytes spécifiques d'un antigène existent avant tout contact avec cet antigène* **Note pour le bilan.** Les nombreux clones de lymphocytes B distincts par leurs anticorps membranaires spécifiques préexistent avant tout contact avec un antigène. Après leur formation dans la moelle osseuse, ils migrent dans les ganglions lymphatiques et la rate, réservoirs de cellules immunitaires. Dans ces organes, en présence d'un ……, les lymphocytes B portant les récepteurs spécifiques sont sélectionnés, prolifèrent formant un clone de même spécificité antigénique : c'est la sélection clonale. Ensuite, ces cellules se différencient en ……..... qui sécrètent des …….. circulants de même spécificité antigénique que les anticorps portés par le lymphocyte B sélectionné.
Réaliser une synthèse	Bilan. **Répondre** au problème posé en introduction.

Clés. Lymphocyte B (LB) ; plasmocyte ; anticorps (immunoglobuline) ; complexe immun ; récepteur ; partie variable ; partie constante ; phagocytose ; macrophage ; antigène ; virus VIH.
Hors TP. immunité acquise ; immunité innée.



Sélection et choix de la représentation de la partie sélectionnée dans la fenêtre active	
avec l'éditeur de commandes	**avec les pictogrammes de choix**
* sélectionne l'ensemble des chaînes affichées dans la fenêtre (permet aussi d'annuler toute sélection plus serrée) ***L** sélectionne la chaîne L **114** sélectionne l'acide aminé n° 114 de toutes les chaînes **20-75** sélectionne les acides aminés du n°20 au n°75 ***L ,*H** sélectionne les chaînes L et H ***L and 20-75** sélectionne les acides aminés de 20 à 75 de la chaîne L **Palette de couleurs** : permet le choix d'une couleur qui affectera la sélection et une couleur de fond (choisir fond blanc pour l'impression)	**Sélectionner** 1 atome en cliquant dessus **Sélectionner** 1 chaîne **Afficher** ce qui est sélectionné, recliquer pour revenir à l'affichage standard
	avec les pictogrammes « affichage »
	Sphères : afficher la sélection sous forme de sphères
	Rubans : afficher la sélection sous la forme d'un ruban

Quelques détails des menus
Fichier / ouvrir : affiche à l'écran la molécule sélectionnée **Fichier / Imprimer** : imprime la molécule affichée ou celle qui est sélectionnée **Editer / sélectionner/Expression** : même fonction que l'éditeur de commande (cf pictogramme) **Atomes/Représentation/rayon fixe** : permet de fixer le diamètre des sphères **Rubans** permet d'afficher la molécule en ruban, sous la forme du squelette carboné notamment **Fenêtres/Mosaïque** : permet d'afficher plusieurs molécules si plusieurs fichiers ont été ouverts
Informations sur les molécules
Le nom des chaînes est donné au bas de l'écran en passant le curseur de souris sur la chaîne (fréquemment H pour chaîne lourde, L pour légère), P ou Y pour les antigènes. Seule la partie terminale des anticorps est modélisée quand il ne s'agit pas de la molécule entière.
ZOOM : shift tenu, bouton gauche de la souris enfoncé, avancer la souris : Zoom avant

Observation d'une molécule en profondeur
L'icône « front » et les deux flèches juxtaposées à droite assurent un déplacement en avant et en arrière de la molécule par rapport à l'écran.